

(19) KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

KOREAN PATENT ABSTRACTS

(11)Publication number: 1020070004541 A

(43)Date of publication of application: 09.01.2007

(21)Application number: 1020067010448

(71)Applicant: BIOBUD CO., LTD.

(22)Date of filing: 29.05.2006

(72)Inventor: YOU, WEON KYOO

(30)Priority: ..

CHOI, WON SEOK
KOH, YOU SEOK
KANG, SEUNG WOO
CHUNG, KWANG HOE

(51)Int. Cl

C12N 15/81

(54) THROMBIN-LIKE RECOMBINANT BATROXOBIN EXPRESSED BY TRANSFORMED PICHIA SP. USEFUL AS HEMOSTATIC AGENT, AND PRODUCTION METHOD THEREOF

(57) Abstract:

PURPOSE: Thrombin-like recombinant batroxobin expressed by Pichia sp. and a production method thereof are provided to reduce the time of hemorrhage and blood coagulation without affecting other blood coagulating factors in blood, so that it is useful as a hemostatic agent. CONSTITUTION: A yeast expression vector pPIC-rBAT containing the thrombin-like recombinant batroxobin is provided, wherein the thrombin-like recombinant batroxobin has the amino acid sequence of SEQ ID NO:1. A transformed yeast, Pichia pastoris GS115 is produced with the expression vector pPIC-rBAT. The thrombin-like recombinant batroxobin is produced by culturing the transformed yeast Pichia pastoris GS115 in a medium of pH 5.0-7.0 at 20-40 deg.C for 12-24 hours, centrifuging the cultured medium, culturing the cells in a medium(pH 5.0-7.0) containing 0.5-1.5%(v/v) methanol at 20-40 deg.C for 72-120 hours, and recovering the thrombin-like recombinant batroxobin by using hydrophobic chromatography and affinity chromatography.

copyright KIPO 2007

Legal Status

Date of request for an examination (20060529)

Notification date of refusal decision (00000000)

Final disposal of an application (registration)

Date of final disposal of an application (20071231)

Patent registration number (1007963600000)

Date of registration (20080114)

Number of opposition against the grant of a patent ()

Date of opposition against the grant of a patent (00000000)

Number of trial against decision to refuse ()

Date of requesting trial against decision to refuse ()



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 일반정정에 의한 정정공고

(45) 공고일자 2008년01월21일
(11) 등록번호 10-0796360
(24) 등록일자 2008년01월14일

(15) 정정정보 정정버전1
정정항목 선행기술조사문헌:
(48) 정정공고일자 2008년04월14일

(51) Int. Cl.
C12N 15/81 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2006-7010448
(22) 출원일자 2006년05월29일
 심사청구일자 2006년05월29일
 번역문제출일자 2006년05월29일
(65) 공개번호 10-2007-0004541
(43) 공개일자 2007년01월09일
(86) 국제출원번호 PCT/KR2003/002318
 국제출원일자 2003년10월31일
(87) 국제공개번호 WO 2005/045022
 국제공개일자 2005년05월19일
(56) 선행기술조사문헌

중국특허공보 제1370833호 (2002.09.25.)*
J Biol Chem, Vol.23:483-490 (1987.03.05.)*
KR1020020064787 A*

* 는 심사관에 의하여 인용된 문헌

전체 청구항 수 : 총 2 항

심사관 : 신원혜

(54) 효모로부터 발현된 재조합 트롬빈 유사 효소 배트록소빈 및 그 생산방법

(57) 요약

본 발명은 효모로부터 발현된 재조합 트롬빈-유사 효소 바트록소빈, 그의 제조방법 및 지혈제 또는 항혈전제로서의 용도에 관한 것이다. 재조합 트롬빈-유사 효소를 발현하기 위하여, 재조합 트롬빈-유사 효소의 cDNA를 클로닝하여 이를 발현시키는 발현 벡터를 제작하고, 형질전환체를 배양하고, 이로부터 재조합 트롬빈-유사 효소를 수득한다. 본 발명의 재조합 트롬빈-유사 효소는 효과적으로 출혈 및 혈액 응고 시간을 감소시키며 다른 여러 가지 혈액 내 혈액 응고 인자들에 대한 영향은 나타내지 않기 때문에, 지혈제로서 사용될 수 있다. 또한, 본 발명의 재조합 트롬빈-유사 효소는, 지혈 조성물 또는 항혈전 조성물에서 유효성분으로 이용될 수 있다.

(72) 발명자

고유석

서울 강남구 도곡동 개포 우성4차아파트 9-306

강승우

서울 마포구 중동 40-12 성산2차 현대아파트

202-1203

정광희

서울 서대문구 연희동 740 성원아파트 102-503

특허청구의 범위**청구항 1**

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

서열목록 1에 기재된 배트록소빈(batroxobin) 단백질 코딩 뉴클레오타이드 서열을 효모 α -factor 분비 신흐 단백질의 C-말단 부위 코딩 뉴클레오타이드 서열에 연결되도록 포함하는 도 2에 도시된 효모 발현 벡터 pPIC-rBAT로 형질전환된 효모(*Pichia pastoris*) GS115 균주를 pH 5.0 내지 7.0인 배지에서 20°C 내지 40°C에서 12 내지 24시간 동안 배양한 다음, 배양물을 원심분리하여 수득한 세포를 배지에 대하여 0.5 내지 1.5%(v/v)의 메탄올을 포함하는 pH 5.0 내지 7.0인 배지에서 20°C 내지 40°C에서 72 내지 120시간 동안 다시 배양한 배양액으로부터 배트록소빈 단백질을 얻는 것을 특징으로 하는 배트록소빈 단백질의 제조방법.

청구항 6

제 5 항에 있어서, a) 상기 배양액으로부터 소수성 크로마토그래피를 이용하여 배트록소빈 단백질의 활성분획을 수득하는 공정; 및 b) 상기 단계 a)의 활성분획을 친화성 크로마토그래피에 적용하여 배트록소빈 단백질을 정제하는 공정을 더욱 포함하는 배트록소빈 단백질의 제조방법.

명세서**기술분야**

본 발명은 효모로부터 발현된 재조합 트롬빈 유사 효소 배트록소빈 및 그 제조방법에 관한 발명으로, 더욱 상세하게는 중남미 독사 (*Bothrops atrox moojeni*)의 독에서 분리한 트롬빈 유사 효소 (batroxobin)를 유전자 재조합 기술을 이용하여 효모 (*Pichia pastoris*)로부터 발현한 재조합 트롬빈 유사 효소 (recombinant batroxobin)와 제조 및 제조 방법에 관한 것이다.

배경기술

일반적으로 뱀독이 사람을 포함한 포유류의 혈액 응고계 및 혈전 용해계에 미치는 영향은 이미 오래 전부터 비교적 자세히 연구되어 왔으며, 다수의 유효 성분들이 분리되고 그 활성이 규명되었다. 뱀독을 구성하는 여러 가지 성분들은 fibrin clotting이나 혈소판 응집 등에 직간접적으로 영향을 주어 응고 촉진제(pro-coagulant)로서 혹은 항응고제(anti-coagulant)로서의 기능들을 가지고 있음이 알려져 있다(참조: Meaume, J. Toxicon, 4, 2558, 1966 Matsui et al., Biochim. Biophys. Acta., 1477, 146-156, 2000). 이들 중 일부 물질들은 이미 기초연구 단계를 지나 혈전증의 진단 및 치료에 광범위하게 사용되고 있다. 특히, fibrinopeptide를 절단하여 fibrinogen을 fibrin으로 전환시키는 트롬빈 유사 단백질 효소(thrombin-like enzyme)에 관한 연구가 매우 활발하게 진행되어 왔으며, 현재 20여종 이상의 단백질들이 보고되었고 일부는 cDNA 서열까지 규명되었다. 트롬빈 유사 효소의 작용은 포유류 본래의 혈액 응고 단백질인 트롬빈과 달리 초기에는 fibrinogen 분자의 fibrinopeptide A를 가수 분해하여 des-A-fibrin이라는 불안정한 fibrin clot을 형성하지만, 시간이 지나면서 이 불안정한 fibrin clot은 생체내의 fibrinolysis system이 가동되면서 빠르게 분해되어 결과적으로 혈중의 fibrinogen 농도를 감소시키게된다(참조: Pirkle, H., and Stocker, K. Thromb. Haemost. 65, 444-450, 1991 Marsh, N.A., Blood Coagul. Fibrinolysis, 339-410, 5, 1994).

실제 임상에서는 이러한 양면적인 효소 특성을 이용하여 지혈제로도 사용하기도하고 혈전의 예방 및 치료제로도 응용하고 있다. 또한, 이 효소는 혈액 내의 다른 응고 인자 등에는 영향을 주지 않을 뿐만 아니라 혈소판의 활성화에도 영향을 미치지 않는 장점이 있어, 수술 1-2 시간 전에 소량 (2 NIH unit/60 kg)을 근육 및 정맥 주사하면 효과적인 지혈 활성을 나타낸다. 반면에 효소의 투여량과 투여 시간을 조절함에 따라 혈중 내 fibrinogen level을 혈전 용해 효소를 사용할 때 생길 수 있는 출혈과 같은 부작용이 없이 낮출 수 있고, 이 과정에서 형성된 des-A-fibrin과 FDP(fibrinogen degradation products)의 방출로 혈관 내피 세포를 자극하여 plasminogen activator의 생성을 유도하며, 트롬빈의 활성을 억제하여 혈전증의 예방과 치료에도 사용되고 있다(참조: Schumacher et al., Thromb. Res. 81, 187-194, 1996; Bell W.R. Jr., Drugs, 54, 18-30, 1997). 최근에는 이러한 트롬빈 유사 효소의 fibrinogen 감소 효과를 이용하여 혜파린 투여로 발생하는 heparin-induced thrombocytopenia (혈전증)이나 acute ischemic stroke (급성 허혈성 뇌졸중)의 치료(참조: Dempfle et al. Blood, 96, 2793 2802, 2000)에도 효과적이라는 보고가 있다.

임상에 실제로 사용되고 있는 트롬빈 유사 효소들은 모두 뱀독에서 분리 정제한 천연형의 단백질들로서 중남미 독사인 *Bothrops atrox moojeni*의 독으로부터 분리한 batroxobin은 이탈리아 Solco Basle Ltd. 사와 스위스 Pentapharm 사에서 판매하고 있으며, reptilase (지혈용), defibrase (혈전 용해용), reptilase-reagent (진단 시약용) 등의 다른 상품명으로도 시판되고 있다. 역시 중남미 독사인 *Bothrops jararaca*의 독에서 정제한 botropase (지혈용, 이탈리아 Ravizza 사), Malayan pit viper, *Calloselasma rhodostoma*의 독에서 분리한 ancrod (미국 Knoll Pharmaceutical 사) 등도 판매되고 있다. 임상에 이용되는 이러한 단백질들 이외에도 20여종의 트롬빈 유사 효소가 다양한 뱀독으로부터 분리 규명되어 보고되어 있으며, cDNA 서열까지 규명된 것들도 있다. 트롬빈 유사 효소의 임상적 유용성이 매우 높기 때문에 재조합 단백질 형태로의 발현 및 정제에 대한 연구도 활발하게 진행되어 왔으나, 트롬빈 유사 효소를 재조합 단백질로서 대량 발현하여 정제한 예는 아직까지 보고된 것이 없다. 대장균으로부터 재조합 트롬빈 유사 효소를 발현하고자 하는 연구가 가장 많이 진행되었으나, 대부분의 재조합 트롬빈 유사 단백질들이 불용성의 봉입체(inclusion body) 형태로 발현되어 수용성의 활성을 가진 단백질로 재증첩(refolding) 과정이 필요하다 (참조: Yang et al., Biotechnol. Lett., 25, 101 104, 2003 Fanet al., Biochem. Mol. Biol. Int. 47, 217-225, 1999 Maeda et al., J. Biochem., 632-637, 109, 1991). 트롬빈 유사 효소는 분자량(약 30 kDa)에 비해 많은 수(6 개)의 이황화 결합(disulfide bond)을 갖는 복잡한 3차 구조를 가지고 있기 때문에 재증첩 조건을 확립하는데 큰 어려움이 있어 현재까지 보고된 바로는 대장균 발현 재조합 트롬빈 유사 효소를 재증첩하여 천연형 효소의 비활성도와 견줄만한 활성을 갖도록 제조한 결과가 없다.

발명의 상세한 설명

본 발명은 상기한 문제점을 해결하고, 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로, 본 발명의 목적은 중남미 독사 (*Bothrops atrox moojeni*)의 독으로부터 분리된 트롬빈 유사 효소의 효모 발현 재조합 형태의 단백질과 단백질의 대량 생산 및 제조 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 전기 효모 발현 재조합 트롬빈 유사 효소의 발현 벡터를 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 전기 발현 벡터로 형질 전환된 형질전환체를 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 전기 재조합 트롬빈 유사 효소의 대량발현을 위한 발효 방법 및 순수 분리 정제 공정을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 전기 재조합 트롬빈 유사 효소를 유효성분으로 함유하는 혈전증 치료제 및 예방제를 제공하는 것이다.

상기한 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 재조합 트롬빈 유사 효소를 발현하는 효모 발현 벡터 pPIC-rBAT를 제공한다.

바람직하게는, 상기의 재조합 트롬빈 유사 효소는 서열목록 1에 기재된 베트록소빈 단백질이다.

본 발명은 또한 상기의 발현벡터 pPIC-rBAT로 형질전환된 효모(*Pichia pastoris*) GS115를 제공한다.

또한, 본 발명은 상기의 형질전환된 미생물을 배양 및 발효하고, 이로부터 재조합 트롬빈 유사 효소를 수득하는 공정을 포함하는 트로빈 유사효소의 제조방법을 제공한다.

본 발명에 있어서, 상기의 방법은 형질전환된 미생물을 pH 5.0 내지 7.0인 배지에서 20°C 내지 40°C에서 12 내

지 24시간동안 배양한 다음, 배양물을 원심분리하여 수득한 세포를 배지에 대하여 0.5 내지 1.5%(v/v)의 메탄올을 포함하는 pH 5.0 내지 7.0인 배지에서 20°C 내지 40°C에서 72 내지 120시간동안 다시 배양하는 것이 바람직하다.

또한 본 발명은 a) 상기 발현된 배양액으로부터 재조합 트롬빈 유사 효소를 소수성 크로마토그래피를 이용하여 활성분획을 수득하는 공정; 및 b) 상기 활성분획을 친화성 크로마토그래피에 적용하여 재조합 트롬빈 유사 효소를 정제하는 공정을 포함하는 재조합 트롬빈 유사 효소의 제조방법을 제공한다.

산업상 이용 가능성

상기에서 살펴본 바와 같이 본 발명에 의하면 재조합 트롬빈 유사 효소는 효과적으로 출혈 및 혈액 응고 시간을 감소시키며 다른 여러 가지 혈액내 혈액 응고 인자들에 대한 영향은 나타내지 않기 때문에, 지혈제로써 사용될 수 있을 뿐만 아니라, 급성 독성 실험 결과, 재조합 트롬빈 유사 효소가 친연형 트롬빈 유사 효소에 비해 독성이 현저하게 감소된 것을 관찰할 수 있으므로, 본 발명의 재조합 트롬빈 유사 효소를 효성분으로 함유하는 지혈제 혹은 혈전증 치료 및 예방제는 재래의 친연형 트롬빈 유사 효소를 이용한 치료 요법에 비하여 부작용과 독성은 현저히 감소시키면서 효과적이고 유용하게 사용될 수 있는 효과가 있다.

본 명세서에 기재된 실시예와 도면에 도시된 구성은 본 발명의 가장 바람직한 일 실시예에 불과할 뿐이고 본 발명의 기술적 사상을 모두 대변하는 것은 아니므로, 본 출원시점에 있어서 이들을 대체할 수 있는 다양한 균등물과 변형예들이 있을 수 있음을 이해하여야 한다.

도면의 간단한 설명

명세서 내에 통합되어 있고 명세서의 일부를 구성하는 첨부도면은 발명의 현재의 바람직한 실시예를 예시하며, 다음의 바람직한 실시예의 상세한 설명과 함께 본 발명의 원리를 설명하는 역할을 할 것이다.

도 1a는 재조합 트롬빈 유사 효소의 활성을 합성 발색 기질(synthetic chromogenic substrate)를 이용하여 친연형 트롬빈 유사 효소 및 친연형 트롬빈과 비교한 도면이다.

도 1b는 재조합 트롬빈 유사 효소의 활성을 혈장 응고 시간의 측정을 이용하여 친연형 트롬빈 유사 효소와 비교한 도면이다.

도 2는 재조합 트롬빈 유사 효소의 발현벡터인 pPIC-rBAT의 유전자지도이다.

도 3은 재조합 트롬빈 유사 효소의 발현 및 정제 과정의 분획들에 대한 SDS-PAGE 분석 도면이다. 사진에서 1번은 재조합 트롬빈 유사 효소를 발현하는 효모의 배양액(1 ml)의 단백질 분획 침전물이고, 2번은 배양액을 소수성 컬럼 크로마토그래피를 통하여 분리한 재조합 트롬빈 유사 효소 분획이며 3번은 전기 시료를 친화성 컬럼 크로마토그래피에 주입하여 최종 분리 정제한 재조합 트롬빈 유사 효소를 나타낸다. 4번은 현재 시판되고 있는 Pentapharm사의 친연형 트롬빈 유사 효소의 SDS-PAGE 분석 도면이다.

도 4a는 재조합 트롬빈 유사 효소의 첫 번째 정제 공정인 소수성컬럼 크로마토그래프 도면이며 굵은 밑줄로 표시된 부분이 트롬빈 유사 효소의 활성을 강하게 나타내는 분획이다.

도 4b는 재조합 트롬빈 유사 효소의 두 번째 정제 공정인 친화성컬럼 크로마토그래프 도면이며 굵은 밑줄로 표시된 부분이 트롬빈 유사 효소의 활성을 나타내는 분획이다.

도 5a는 재조합 트롬빈 유사 효소에 의해 생성되는 fibrin clot을 보여주는 사진이다.

도 5b는 역상 자이로그래프를 이용하여 재조합 트롬빈 유사 효소의 fibrin clotting 활성을 보여주는 사진이다.

도 6a는 동물 실험 모델을 이용하여 재조합 트롬빈 유사 효소와 친연형 단백질에 의한 출혈 시간(bleeding time)의 감소를 측정, 비교한 도면이다. 도면에서는 동물 (rat) 실험 모델을 이용하여 재조합 트롬빈 유사 효소와 친연형 트롬빈 유사 효소를 1 NIH unit/kg의 투여량으로 꼬리 정맥에 주사한 다음, 1시간 30분 후 꼬리 끝부분에서 5 mm 되는 부분을 절단하여 출혈이 멈추는 시간을 PBS 완충 용액상에서 측정하였으며, 대조군은 PBS 완충 용액만을 투여한 동물을 사용하였다.

도 6b는 동물 실험 모델을 이용하여 재조합 트롬빈 유사 효소와 친연형 단백질에 의한 전혈 응고 시간(Whole blood clotting time)의 감소를 비교한 도면이다. 도면에서 동물 (rat) 실험 모델을 이용하여 재조합 트롬빈 유사 효소와 친연형 트롬빈 유사 효소를 2 NIH unit/kg의 투여량으로 꼬리 정맥에 주사한 다음, 각각 1시간, 4시

간 경과 후 채혈하여 혈액 응고 시간을 측정하였으며, 대조군은 PBS 완충 용액만을 투여한 동물을 사용하였다.

도 6c는 동물 실험 모델을 이용하여 재조합 트롬빈 유사 효소와 천연형 단백질에 의한 PT, APTT, TT 의 변화를 측정한 도면이다. 도면에서 동물 실험 모델을 이용하여 재조합 트롬빈 유사 효소와 천연형 트롬빈 유사 효소를 0.1 NIH unit/kg의 투여량으로 꼬리 정맥에 주사한 다음, 2시간 경과 후 채혈하여 혈장을 분리하여 각각의 혈장에 대한 PT, APTT, TT 등을 ACL 자동 혈액 응고 검사 장비를 사용 측정하였으며, 대조군은 PBS 완충 용액만을 투여한 동물을 사용하였다.

도 7은 재조합 트롬빈 유사 효소와 천연형 단백질에 대한 pH에 따른 안정성을 비교한 도면이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

본 발명을 간단히 설명하면 다음과 같다.

본 발명자들은 임상에서 유용하게 사용하고 있는 트롬빈 유사 효소의 cDNA를 유전자 재조합 기술을 이용하여 효모에서 발현 분비될 수 있는 재조합 트롬빈 유사 효소를 개발하였다. 재조합 트롬빈 유사 효소를 효모에서 대량 발현하여 제조한 예는 현재까지 보고된 바 없으며, 효모 발현 재조합 트롬빈 유사 단백질은 효모에서 발현되어 효모 세포 밖으로 분비되도록 고안하였기 때문에 대장균 발현 단백질의 경우에서처럼 봉입체로부터 활성을 갖는 재조합 단백질로 만드는 재증첩 과정이 없이 제조할 수 있다는 장점이 있다. 또한, 발현된 재조합 단백질이 효모 세포 밖으로 분비되므로 천연형의 트롬빈 유사 효소를 뱀독으로부터 제조하는 것에 비해 정제 과정을 단순화하여 생산성을 높일 수 있다는 유리한 점이 있을 것으로 기대하여 본 발명을 수행하게 되었다.

또 본 발명자들은 재조합 트롬빈 유사 효소를 유전자 재조합 기술을 이용 효모의 대량 발효(fed-batch fermentation) 과정을 통해 다량 생산할 수 있는 기술을 개발하였으며, 생산된 효소는 효모 세포 밖으로 분비되고, 일련의 정제 과정을 통하여 순수한 트롬빈 유사 효소를 제조할 수 있다. 본 발명을 통해 제조된 재조합 트롬빈 유사 효소는 SDS-PAGE 분석 결과, 천연형의 트롬빈 유사 효소에 비해 순도가 높으며 여러 가지 활성 확인 실험을 통해 단백질 비활성도 역시 1.5배 좋은 것으로 나타났다. 또한, 효모 발현 재조합 트롬빈 유사 효소의 전임상 독성 실험 결과 천연형의 트롬빈 유사 효소에 비해 독성이 적은 것으로 나타났으며, 동물 실험 모델을 통한 약리 효능 실험 결과(Efficacy test)에서는 천연형 단백질보다 우수한 것을 확인할 수 있었다. 그리고, 안정성 실험(Stability test) 결과에서도 재조합 트롬빈 유사 효소가 천연형과 비교하여 다양한 pH 조건에서 뛰어난 안정성을 보여 주었다. 따라서, 효모에서 발현된 재조합 트롬빈 유사 효소는 지금까지 개발된 천연형의 효소에 비해 임상 사용시에 매우 유리한 점을 많이 가지고 있다고 할 수 있다.

본 발명자들은 트롬빈 유사 효소들 가운데 가장 활성이 강한 것으로 알려진 효소(batroxobin)의 재조합 단백질(recombinant protein)을 발현 및 정제하기 위하여 한국산 살모사(*Gloydus halys*)로부터 분리된 트롬빈 유사 효소(salmonin)의 cDNA(GeneBank Accessionno. AF056033)를 주형으로 하여 batroxobin을 코딩하는 cDNA로 유전자 조작 기술을 이용해서 변환시켰다. 전기 구축된 batroxobin의 cDNA를 이용하여 재조합 트롬빈 유사 효소를 발현시키는 벡터 및 이를 사용하여 형질전환된 형질전환체를 제작하고, 이로부터 재조합 트롬빈 유사 효소를 제조하였다.

이하, 본 발명의 재조합 트롬빈 유사 효소 및 제조방법을 보다 구체적으로 설명하고자 한다.

한국산 살모사의 독소 분비선로부터 구축한 cDNA 라이브러리에서 찾아낸 트롬빈 유사 효소(salmonin)의 cDNA와 batroxobin cDNA의 염기 서열을 비교 분석하여 batroxobin을 코딩하는 cDNA로 유전자 재조합 기술 등을 이용하여 전환시켰다. 재조합 트롬빈 유사 효소(recombinant batroxobin)을 효모로부터 발현 및 정제하기 위하여 상기 전환된 batroxobin cDNA의 말단에 제한효소(XbaI) 염기서열과 단백질 분해효소인 KEX2로 절단될 수 있는 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열을 추가한 다음, 8.0kbp크기의 효모 발현 벡터인 pPIC9(Invitrogen, USA)의 α -factor 분비 신호 단백질 C-말단부위의 XbaI-EcoRI 좌우에 삽입하여 발현벡터 pPIC-rBAT을 제작하였다. 제작된 발현벡터를 *Pichia* 속, *Hansenula* 속, *Saccharomyces* 속 등의 효모에 도입하여 형질전환체를 제조할 수 있는데, 사용되는 효모로서는 파치아 파스토리스(*Pichia pastoris*) GS115, SMD 1168, KM71 등의 파치아 파스토리스종 효모를 사용함이 바람직하다.

파치아 파스토리스(*Pichia pastoris*) GS115에 전기 벡터 pPIC-rBAT을 도입하여, 형질전환체를 제조하였다. 형질전환체를 (GSrBAT)라 명명하였다.

재조합 트롬빈 유사 효소를 제조하는 방법은 전기 형질전환체를 배양하고, 이로부터 재조합 트롬빈 유사 효소를 정제하는 과정을 포함한다: 이때, 형질전환체를 배양하는 방법은 형질전환체를 최소 글리세롤 배지에 접종하여

0.D600 1.0이 될 때까지 배양하고, 원심분리하여 배양액을 제거한 세포를 수득한 다음, 메탄올이 함유된 최소 메탄올 배지에 전기 세포를 혼탁한 후, 유가식으로 배양하는 것이다. 사용되는 최소 글리세롤 배지는 질소원으로서 효모추출물 또는 펩톤 등을 0.5 내지 1.5%정도 포함하고, 탄소원으로서 글리세롤, 데스트로스 또는 글루코스 등을 0.5 내지 2.5%정도 포함하며, 그 외 극미량의 바이오틴(biotin) 등을 포함하는 pH 5.0 내지 7.0, 바람직하게는 pH 5.5 내지 6.5 (최적 pH는 6.0), 최소 메탄올 배지는 최소 글리세롤 배지에 탄소원으로서 배지에 대하여 0.1 내지 1.0%(v/v), 바람직하게는 0.3 내지 0.8%(v/v), 가장 바람직하게는 0.5%(v/v)의 메탄올을 함유한 배지이다. 또한, 배양 조건은 20°C 내지 40°C, 바람직하게는 25°C 내지 35°C, 가장 바람직하게는 30°C에서 12 내지 24시간, 바람직하게는 16 내지 20시간, 가장 바람직하게는 18시간동안 배양한다.

한편, 재조합 트롬빈 유사 효소를 정제하는 공정은 전기 형질전환체를 배양한 배양액을 소수성 컬럼과 친화성 컬럼에 적용하여 재조합 단백질을 순수 분리 정제하는 것이다. 사용되는 소수성 컬럼에 충진되는 레진으로는 페닐-세파로스(phenyl-Sepharose), 뷰틸-세파로스(butyl-Sepharose), 옥틸-세파로즈(octyl-Sepharose)등을 사용함이 바람직한데, 사용되는 이동상으로는 0.5 내지 2M 암모늄 살레이트(ammonium sulfate) 용액을 사용함이 바람직하다. 또한, 친화성 컬럼으로는 heparin-세파로스, benzamidine-세파로스 컬럼을 사용함이 바람직하고, 이동상으로는 NaCl이 포함된 Tris-HCl 완충 용액을 사용함이 바람직하다.

상기 제조된 재조합 트롬빈 유사 효소와 스위스 Pentapharm에서 시판되고 있는 천연형 batroxobin의 fibrinogen clotting 활성 및 합성한 발색 기질의 분해 활성을 비교한 결과, 본 발명의 재조합 트롬빈 유사 효소의 비활성도가 1.5배 정도 우수한 것으로 판명되었다(도 1). 또한, 최종 정제된 재조합 트롬빈 유사 효소와 천연형 트롬빈 유사 효소의 SDS-PAGE 분석 결과, 본 발명에 의해 효모에서 분리 제조한 재조합 트롬빈 유사 효소의 순도가 천연형에 비해 높은 것을 확인할 수 있었으며 (도 3), 천연형의 복잡한 정제 과정과 비교하여 본 발명에서 고안된 재조합 트롬빈 유사 효소의 정제 과정은 크게 단순화되어 두 가지 컬럼만을 이용하여 고순도의 재조합 단백질을 얻을 수 있는 장점을 가지고 있고 재조합 단백질의 생산성 향상에 기여할 것으로 기대된다(도 4).

아울러, 재조합 트롬빈 유사 효소가 실제로 동물 실험 모델에서 지혈 활성을 가지고 있는지 여부를 확인하기 위하여, rat을 이용한 동물 실험에서 재조합 트롬빈 유사 효소와 천연형 단백질에 의한 지혈 효과 및 혈액내 여러 혈액 응고 인자에 미치는 효과 등을 ACL 자동 혈액 응고 검사 장비를 이용 조사하였다. 동물 실험 결과, 재조합 트롬빈 유사 효소는 효과적으로 출혈 시간과 전혈 응고 시간을 단축시키는 등의 지혈 활성을 보여주었으며, 활성 역시 천연형에 비해 우수한 것으로 나타났다 (도 6a, 6b). 반면에, 재조합 트롬빈 유사 효소와 천연형 트롬빈 유사 효소 모두 혈액내의 여러 가지 혈액 응고 인자들에 대해서는 유효범위 안에서 별다른 영향을 주지 못하였다 (도 6c). 생체 내(*in vivo*) 또는 시험관(*in vitro*) 실험에서 재조합 트롬빈 유사 효소의 비활성도가 천연형에 비해 높은 것으로 나타났으며, 이는 효소의 안정성과 관련이 있을 것으로 예상되어 재조합 트롬빈 유사 효소와 천연형 트롬빈 유사 효소의 안정성을 조사하였다. 합성 발색 기질을 이용한 안정성 실험 결과, 재조합 트롬빈 유사 효소의 안정성이 천연형 단백질에 비해 다양한 pH 조건에서 월등히 뛰어난 것을 확인할 수 있었다 (도 7).

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

실시예 1: 재조합 트롬빈 유사 효소의 클로닝

트롬빈 유사 효소들 가운데 현재 임상에 사용되고 있고 매우 강력한 지혈 활성을 보이는 batroxobin의 재조합 단백질 발현을 위한 cDNA를로닝을 한국산 살모사(*Gloiodius halys*)로부터 정제된 신규한 트롬빈 유사 효소(salmobin)의 cDNA를 이용하여 수행하였다. 한국산 살모사로부터 정제된 신규한 트롬빈 유사 효소(salmobin)의 아미노산 서열은 batroxobin과 높은 아미노산 서열 유사성을 가지고 있어, 두 단백질에서 동일한 염기 서열을 갖는 부분과 batroxobin에만 특이한 염기 서열을 갖는 부분으로 구성된 변형용 올리고 프라이머를 합성하였고 이를 이용한 반복적인 중합 효소 연쇄 반응(PCR, polymerase chain reaction)을 실시하여 중남미 독사의 독선 유래 트롬빈 유사 효소인 batroxobin의 cDNA를 클로닝하였다.

실시예 2: 재조합 트롬빈 유사 효소의 발현벡터 제작

제한효소(XbaI) 염기서열과 단백질 분해효소인 KEX2로 절단 될 수 있는 아미노산 서열을 암호화하는 염기서열을 포함하는 N-말단 프라이머(서열목록 2)인 5-CTCGAGAAAGAGTCATTGGAGGTGATG-3, 두 개의 번역 종결 코돈(stop codon)과 BamHI 제한 효소 부위를 포함하는 C-말단 프라이머(서열목록 3)인 5-

TTACGGGCAAGTCGCAGTTTATTCctGCAAtAATcgTC3 및 주형으로서 실시예 1에서 수득한 트롬빈 유사 효소 cDNA를 갖는 플라스미드를 사용하고, 로보사이클러(Robocycler™, Stratagen USA)를 사용하여 중합 효소 연쇄반응(PCR: polymerase chain reaction)을 실시하였다. PCR반응은 열변성(denaturation) 94°C 1분 30초, 주형과 프라이머 결합(annealing) 52°C 1분 및 프라이머 연장반응(polymerization) 72°C 1분 30초의 반응을 1주기(cycle)로하여 30주기를 실시하였다. 이 반응으로부터 증폭된 약 709bp의 DNA절편을 PCR 산물 전용 클로닝 플라스미드인 pGEM-Teasy(3.015kbp, Promega, USA)에 T4 DNA 연결효소(Ligase)와 반응시켜 재조합 플라스미드를 작제하고 (pGEM-rBAT), 이를 대장균 XL1 Blue에도입하여 형질전환체를 작제하였다. 작제된 형질전환체를 앰피실린 50 μ g/ml가 첨가된 루리아 보타니(LB: Luria Botani)평판 배지에서 배양하여, 흰색 콜로니를 형성하는 형질전환 대장균 균주를 선별한 다음, 이로부터 플라스미드(pGEM-rBAT)를 추출하여 이를 제한효소 지도분석과 DNA 염기서열 분석(Genotech, 대전, 한국)을 실시한 결과, PCR반응으로 증폭된 709bp의 절편이 재조합 트롬빈 유사 효소의 효모 발현용 cDNA 임을 확인하였다. 전기 추출된 pGEM-rBAT 플라스미드를 XhoI과 BamHI으로 절단하여 수득한 DNA절편을 효모 발현벡터 pPIC9(8.0kbp)의 α -factor 분비신호단백질 C-말단부위에 삽입하여 재조합 트롬빈 유사 효소의 효모 발현벡터 pPIC-rBAT(가명:pPIC9 recombinant Batroxobin: 8.7 kbp)를 작제하였다(참조: 도 2).

실시예 3: pPIC-rBAT 형질 전환체 작제

상기 작제된 pPIC-rBAT를 SalI으로 절단하여 선형의 DNA를 수득한 다음, 전기 선형의 DNA를 0.5 μ g/ μ l 농도로 함유하는 TE 완충용액과 *Pichia pastoris*(GS115 균주, Invitrogen) 캠피턴트 세포(competent cell) 80 μ l를 혼합하고, 엘렉트로포레이터(Electroporator, Bio-Rad Gene Pulser, U.S.A.)를 사용하여 1.5 KV의 전압조건 하에 형질전환을 수행하였다. 이어, 형질전환된 균주를 히스티딘 결손 아가로스 평판 배지에 도말하고, 30°C에서 3일간 배양하였다. 배양 후, 배지에서 성장한 콜로니를 선별하여 최소 글리세롤 배지(100mM Sodium Phosphate pH 6.0, Yeast Nitrogen Base 1.34%, biotin 4 x 10-5%, glycerol 1%) 1L에 접종한 다음, 30°C에서 세포농도가 0.600 1.0이 될 때 까지 배양하고, 배양물을 3,000 xg에서 원심 분리하여 배지가 제거된 세포만을 수득하며, 수득한 세포를 최소 메탄올 배지(100mM Sodium Phosphate pH 6.0, Yeast Nitrogen Base 1.34%, biotin 4 x 10-5%, methanol 0.5%)에 혼탁시키고, 30°C에서 배양하여, 재조합 트롬빈 유사 효소의 발현을 유도하였다. 이어, 24시간 간격으로 메탄올을 0.5%의 농도로 첨가하며 96시간 동안 배양한 결과, 배지내에 재조합 트롬빈 유사 효소가 축적됨을 확인하였다. 전기 형질전환 균주를 "GSrBAT"라 명명하였다.

실시예 4: 재조합 트롬빈 유사 효소의 발현 및 정제

상기 효모 배양물을 5000 xg에서 원심 분리하여 배양액을 수득하고, 이를 2.5M 암모늄 셀레이트 용액으로 평형화시킨 폐닐-세파로스(phenyl-Sepharose, Amerchambioscience, U.S.A.)가 충진된 컬럼(1.3 x 20cm)에 주입한 다음, 2.5M 0M의 암모늄 셀레이트 용액농도 선형구배(linear gradient)를 0.5ml/min의 유속으로 용출시켜 재조합 트롬빈 유사 효소활성분획을 수득하였다(참조: 도4a), 이때, 재조합 트롬빈 유사 효소의 활성은 실시예 1과 동일한 방법으로 수행하였다. 이어, 수득한 활성분획을 모아서 20 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.5)에서 8시간씩 3회에 걸쳐 투석(dislysis)한 다음, 동일 완충 용액으로 평형화된 친화성 컬럼(heparin-Sepharose, 1 x 5 cm)에 주입시키고, 1M 염화나트륨(NaCl)을 포함하는 동일 완충 용액을 이용하여 0 내지 1M 까지 선형구배(linear gradient)를 1ml/min의 유속으로 단백질을 용출시켜서, 순수분리된 재조합 트롬빈 유사 효소를 수득하였다(도 4b). 이때, 체조 수율은 배양액 1L당 약 7mg임을 확인하였다.

재조합 트롬빈 유사 효소의 아미노산 서열을 분석하기 위하여, 정제된 재조합 트롬빈 유사 효소를 환원조건 하에서 전기영동한 다음, PVDF(Bio-Rad, U.S.A.) 맴브레인으로 일렉트로블라팅(electroblotting)하였으며, 자동 아미노산 서열분석기를 이용하여 N-말단 아미노산의 서열을 분석한 결과, VIGGDECDIN의 서열인 것으로 확인되어 재조합 트롬빈 유사 효소가 효모에서 제대로 발현되었음을 확인하였다.

실시예 5: 재조합 트롬빈 유사 효소와 천연형 트롬빈 유사 효소 활성 비교

재조합 트롬빈 유사 효소와 천연형 트롬빈 유사 효소의 활성을 비교하기 위하여 합성한 발색 기질의 분해 활성을 측정하였으며 사람 혈장의 응고 시간의 변화를 시료 농도별로 ACL 자동 혈액 응고 검사 장비를 이용하여 관찰하였다. 재조합 트롬빈 유사 효소와 천연형 트롬빈 유사 효소를 동일한 양으로 동일한 합성 발색 기질과 반응하여 합성 발색 기질의 분해를 405 nm에서의 흡광도 변화로 측정하였다. 여러 가지 합성 발색 기질에 대한 트롬빈 유사 효소의 분해 활성은 재조합 단백질이나 천연형 단백질 모두 유사한 양상을 보여주고 있으며, 재조합 트롬빈 유사 효소의 비활성도가 높은 것을 확인할 수 있었다(참조: 도 1a). 트롬빈 유사 효소의 실제 혈액내 지혈 활성을 알아보기 위하여, 사람 혈액으로부터 혈장을 분리한 후, 재조합 트롬빈 유사 효소와 천연형 트롬빈 유사 효소를 동일한 양의 농도 구간별로 첨가한 다음, ACL 자동 혈액 응고 검사 장비를 이용하여

PT(prothrombin time)를 측정하였다. 실험 결과, 트롬빈 유사 효소의 첨가 농도에 따라 응고 시간이 증가됨을 확인할 수 있었으며, 비활성도는 합성 발색 기질을 이용한 활성 측정시와 마찬가지로 재조합 트롬빈 유사 효소가 천연형에 비해 1.5배 정도 우수한 것으로 나타났다 (참조: 도 1b).

실시예 6: 재조합 트롬빈 유사 효소의 fibrin 응고 활성

재조합 트롬빈 유사 효소에 의한 fibrin 응고 활성을 시험관 (in vitro) 실험과 역상 자이모그라피(reverse zymography) 실험을 이용하여 측정하여 천연형 트롬빈 유사 효소와 비교하였다. 도 5a에서 보듯이 재조합 트롬빈 유사 효소를 0.5% 사람 fibrinogen 용액에 넣어 반응시키면 불용성의 fibrin clot이 생성되어 수용성의 염색약과의 혼합이 일어나지 않음을 확인할 수 있었으며, 도 5b의 역상 자이모그라피 상에서도 0.5% fibrinogen-agar 평판에서 불용성의 fibrin clot이 재조합 트롬빈 유사 효소의 단백질 위치에서 형성되는 것을 관찰하였다.

실시예 7: 재조합 트롬빈 유사 효소의 동물 실험 모델에서의 출혈시간 및 전혈 응고 시간 감소 활성

재조합 트롬빈 유사 효소의 임상 적용 가능성을 알아보기 위하여 rat를 이용한 동물 실험 모델에서의 출혈 시간 감소 활성을 천연형 트롬빈 유사 효소와 비교하였다. 태어난지 8주 정도되는 rat를 가지고 실제 임상에 사용하는 정도의 시료를(1 NIH unit/kg) 꼬리 정맥에 약 1ml 주사한 다음 1시간 30분 경과 후에 rat의 꼬리 5mm 되는 부분을 절단하여 PBS 완충 용액상에서 출혈이 멈추는 시간(bleeding time)을 측정하였으며, 대조군으로는 PBS 완충 용액만을 주사한 동물을 사용하였고 각 군별로 5마리의 실험 동물을 사용해서 수행하였다.

도 6a에서 보듯이, 재조합 트롬빈 유사 효소나 천연형 유사 효소를 주사한 동물들의 출혈 시간이 대조군에 비해 짧은 것을 확인할 수 있었으며 이는 트롬빈 유사 효소의 지혈 활성에 의한 결과로 판단되고, 재조합 트롬빈 유사 효소의 지혈 효과가 더 좋은 것을 알 수 있었다.

아울러, 시료 처리에 의한 전혈 응고 시간의 감소 효능도 동물 실험 모델을 통하여 측정하였다. 재조합 트롬빈 유사 효소와 천연형 트롬빈 유사 효소를 2 NIH unit/kg의 양으로 rat의 꼬리 정맥에 주사한 다음, 1시간, 4시간의 시간 경과 후, 실험 동물로부터 전혈을 채혈하여 전혈 응고 시간을 측정하였으며 대조군으로는 PBS 완충 용액을 주사한 동물의 혈액을 사용하였고 각 군당 5마리의 동물을 사용해서 수행하였다. 전혈 응고 시간은 1.5 ml 투브(eppendorf tube)에 채혈한 혈액 0.5 ml을 10 mM CaCl₂과 같이 혼합한 다음, 45도의 경사와 2 rpm/min의 속도로 흔들어 주면서 혈액이 응고되는 시간을 측정하였다. 전혈 응고 시간도 출혈 시간 측정 실험 결과와 마찬가지로 트롬빈 유사 효소들을 처리한 혈액들의 응고 시간이 대조군에 비해 감소되었으며, 재조합 트롬빈 유사 효소의 활성이 천연형 트롬빈 유사 효소에 비해 우수한 것을 확인할 수 있었다(참조: 도 6b).

실시예 8: 재조합 트롬빈 유사 효소에 의한 동물 실험 모델에서의 PT, APTT, TT 변화 측정

상기한 바와 같이, 재조합 트롬빈 유사 효소는 천연형 유사 효소처럼 불용성의 fibrin clot을 형성하는 지혈 활성을 가지고 있음을 몇 가지 실험 등을 통하여 증명하였다. 따라서 이러한 재조합 트롬빈 유사 효소의 활성에 의해 혈액내의 다른 여러 가지 혈액 응고 인자들에 대해 영향을 미치는 지의 여부를 확인하기 위해 동물 실험 모델을 이용하여 혈액의 PT, APTT, TT의 변화를 측정하였다. 재조합 트롬빈 유사 효소와 천연형 트롬빈 유사 효소를 0.1 NIH unit/kg의 농도로 rat의 꼬리 정맥에 주사한 다음 2 시간 후, 혈액을 채혈하여 혈장을 분리하고 분리된 각 혈장에 대해서 ACL 자동 혈액 응고 장비를 이용하여 PT(prothrombin time), APTT(activated partial thromboplastin time), TT(thrombin time)의 변화를 측정하였다. 이들 변화는 in vivo 상태에서의 포유류 혈액 응고계의 여러 응고 인자들에 대한 변화를 간접적으로 측정할 수 있는 assay 방법이다. 한 편 대조군은 PBS 완충 용액을 주사한 동물의 혈장이었으며 각 군당 5마리의 동물을 사용하여 수행하였다. 모든 측정 항목의 경향이 비슷한 결과를 보여주었는데, 시료를 주사한 동물의 혈장들이 각 항목에서 약간의 증가를 나타내고 있으나 유호 범위내의 수치로 큰 변화는 보여주지 못하였다 (참조: 도 6c). 이러한 실험 결과를 토대로, 재조합 트롬빈 유사 효소는 지혈 효소로서 가지고 있는 활성에 비하여 혈액내의 여러 가지 다른 혈액 응고 인자들에 대한 영향이나 변화를 크게 주지 않는다는 결론을 내릴 수 있다.

실시예 10: 재조합 트롬빈 유사 효소와 천연형 트롬빈 유사 효소의 안정성 측정

상기 여러 가지 활성 비교 실험에서 나타난 결과, 재조합 트롬빈 유사 효소의 활성이 천연형에 비해 더 우수한 것으로 보여지며, 이는 단백질의 안정성과 상당 부분 관련이 있을 것이라 예상하고 재조합 트롬빈 유사 효소와 천연형 유사 효소의 안정성을 여러 가지 pH 조건에서 단백질의 활성 유지를 측정함으로써 비교 분석하였다. 도 7의 실험 결과와 같이, 재조합 트롬빈 유사 효소의 안정성이 각각의 조건에서 매우 우수한 것을 확인할 수 있었다. 이러한 실험 결과는 최종 분리 정제된 단백질의 순도와 밀접한 관계가 있을 것으로 판단되며, 재조합 트롬

빈 유사 효소의 순도가 천연형에 비해 매우 높은 것은 상기 SDS-PAGE 분석을 통하여 확인 할 수 있다.

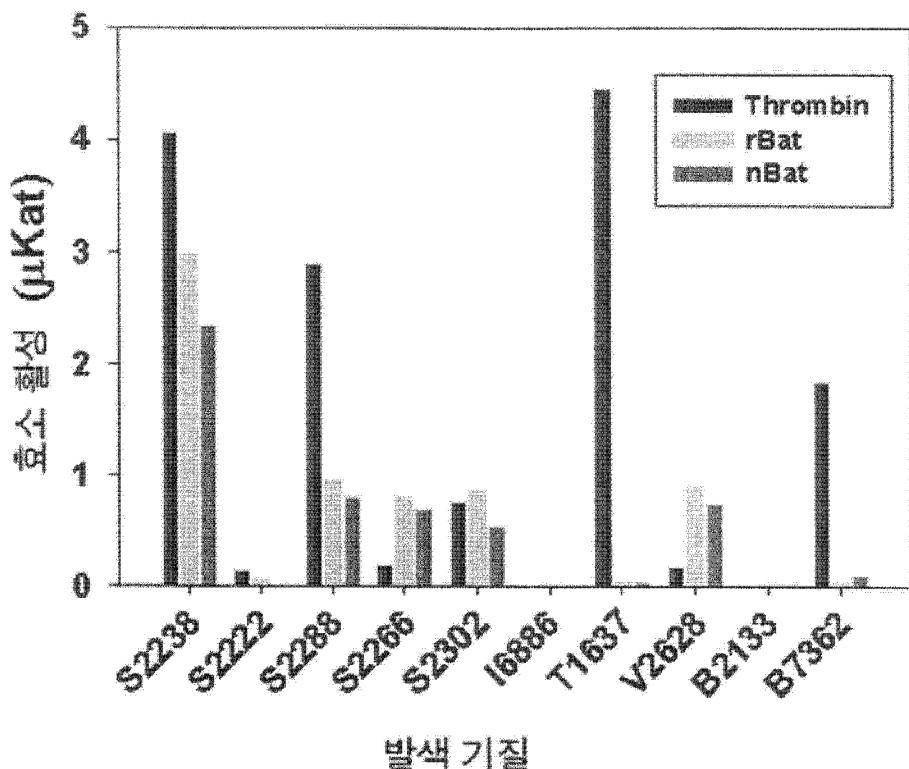
급성독성 시험

본 발명에서 지혈제 혹은 혈전증 치료 및 예방제로서 사용되는 재조합 트롬빈 유사 효소의 단회 정맥 투여 급성 독성을 알아보기 위하여, 재조합 트롬빈 유사 효소를 웅성 rat에 정맥 주사하고, 투여 후 7일간에 걸쳐 마우스의 사망수를 관찰하여 최소치사량(MLD, minimum lethal dose)을 결정하였는데 수컷에서는 600 NIH unit/kg 이상, 암컷에서 600 NIH unit/kg으로 판단되었다. 이러한 수치는 천연형 트롬빈 유사 효소의 LD50 값이 약 300 NIH unit/kg인 것에 비하면 급성 독성이 현저하게 감소한 결과이다. 따라서 하기에 표시하는 유효성분의 범위에서, 본 발명의 재조합 트롬빈 유사 효소를 유효성분으로 함유하는 지혈제 또는 혈전증 치료 및 예방제는 충분히 안전한 약물임을 알 수 있다.

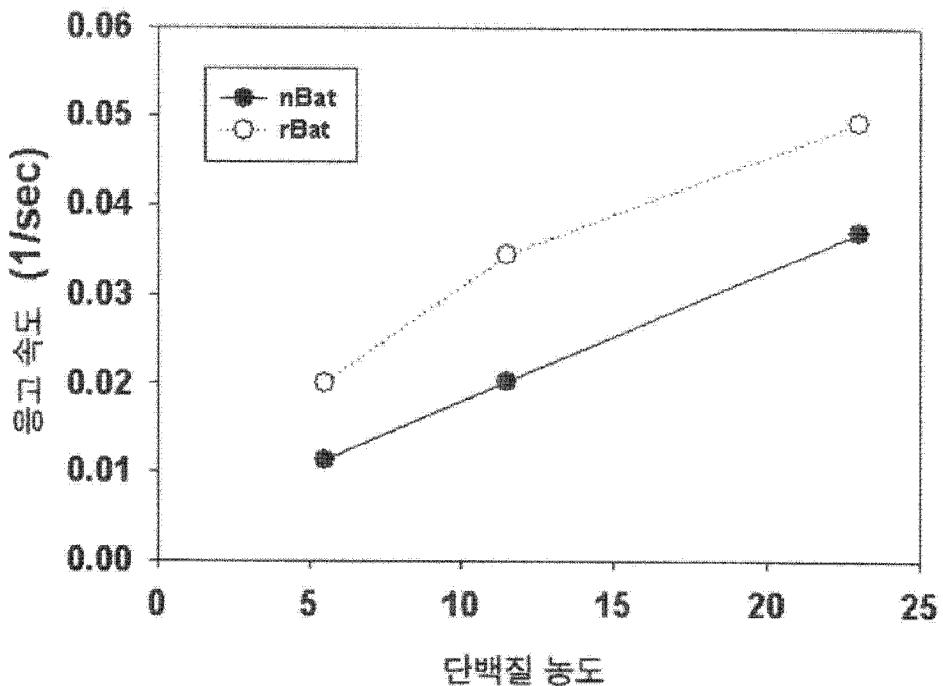
이상에서 상세히 설명하고 입증하였듯이, 본 발명은 효모에서 발현한 재조합 트롬빈 유사 효소와 형질 전환 효모의 대량 발효 공정, 재조합 트롬빈 유사 효소의 대량 정제 및 제조 방법, 이를 유효성분으로 하는 지혈제 또는 혈전증 치료 및 예방제를 제공한다. 재조합 트롬빈 유사 효소는 형질 전환된 효모를 대량 발효한 배양액으로부터 소수성 컬럼과 친화성 컬럼의 두 단계 정제 과정을 통하여 대량으로 생산할 수 있다. 본 발명에 의하면, 재조합 트롬빈 유사 효소는 효과적인 지혈 효과를 보여주고 기타 다른 혈액 응고 인자들에 대한 영향이 거의 없으며 천연형에 비해 투여로 인해 발생하는 급성 독성의 최소 치사량이 매우 낮으므로 재조합 트롬빈 유사 효소를 유효성분으로 함유하는 지혈제는 종래의 천연형을 이용한 치료요법에 비하여 부작용이나 독성은 현저히 감소시키면서 실제 임상에 효과적이고 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

도면

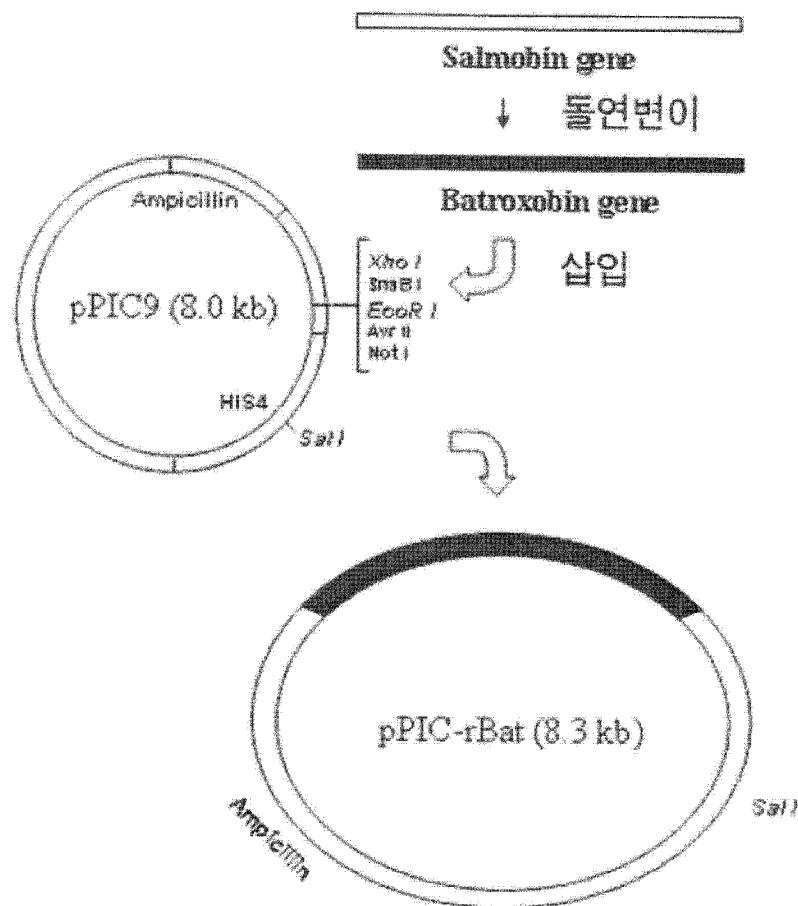
도면 1a



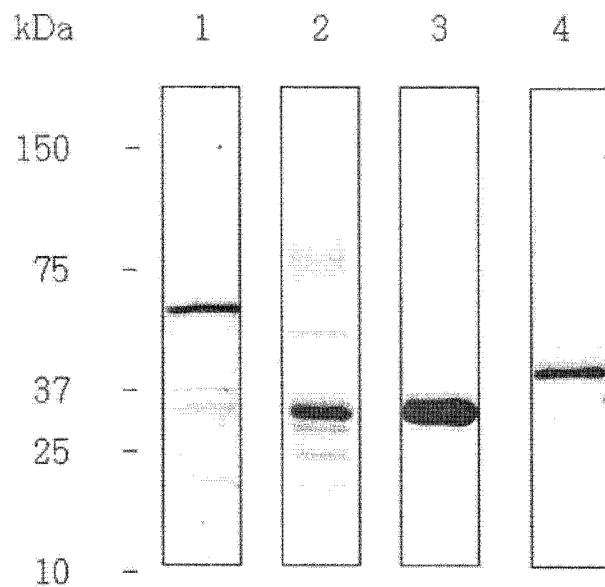
도면1b



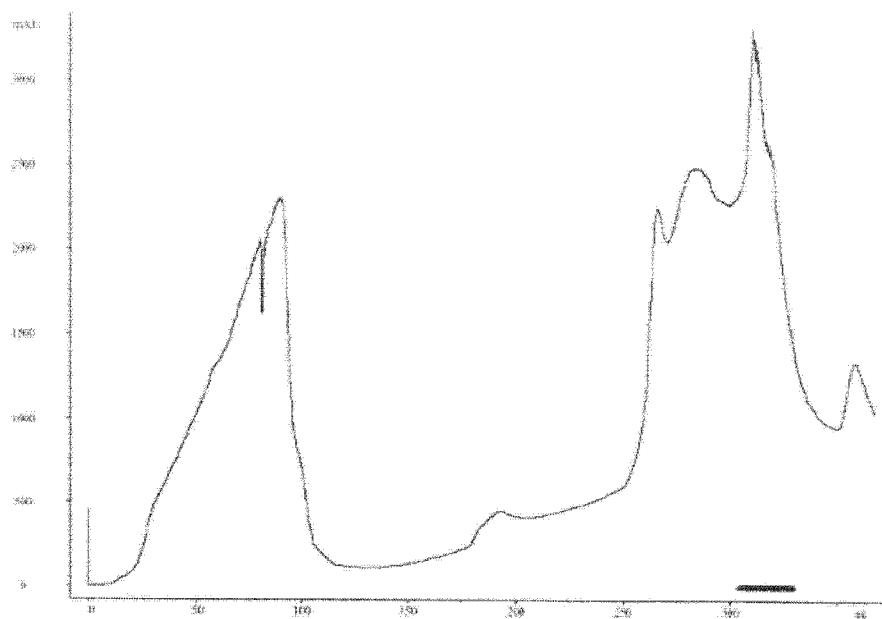
도면2



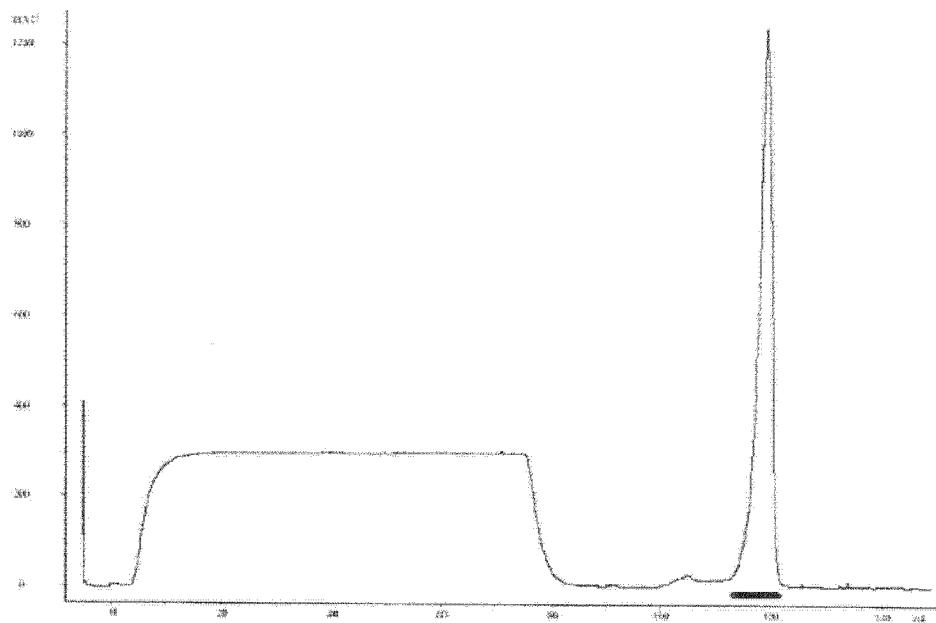
도면3



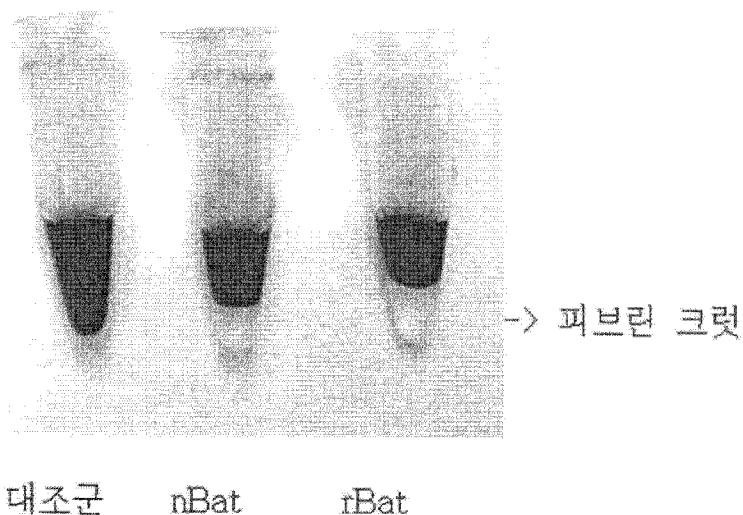
도면4a



도면4b

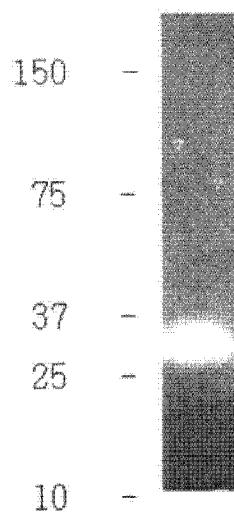


도면5a



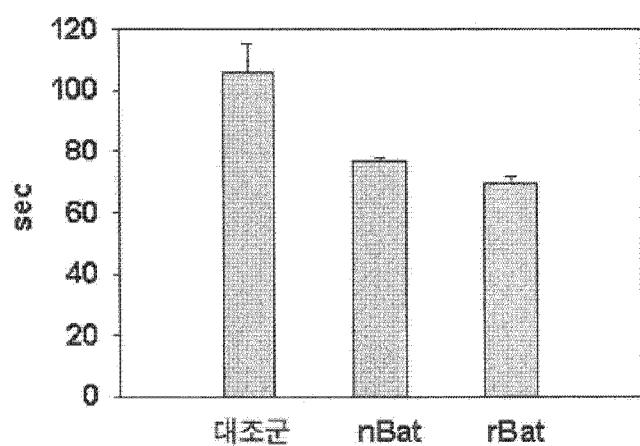
도면5b

kDa



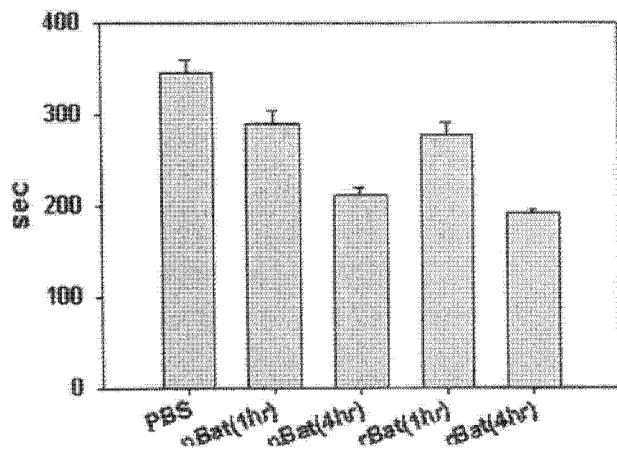
도면6a

출혈 시간

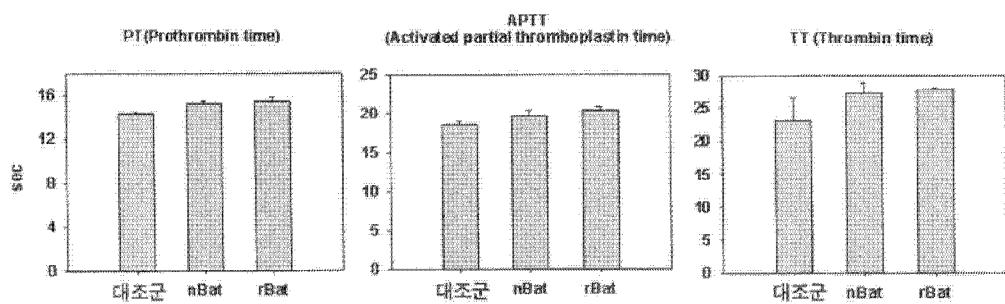


도면6b

전혈 응고시간



도면6c



도면7

